

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Zürich
Direktor: Professor F. Leuthardt

Vergleichende Untersuchungen am isolierten
Rattenzwerchfell über den Einfluss des Insulins auf die
Fruktose- und Glukoseverwertung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

RICHARD MEYER

Deutscher Staatsangehöriger

Genehmigt auf Antrag von Prof. F. Leuthardt

ZÜRICH 1954

Buchdruckerei B. Blöchlinger, Luzern



MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507227_0081

Es war schon früh bekannt, daß sich die Fruktose im Stoffwechsel in vieler Hinsicht anders verhält wie die Glukose. Insbesondere schien sie im diabetischen Organismus bedeutend besser verwertet zu werden als Traubenzucker. *Külz* (1874) verabreichte an Diabetiker beträchtliche Mengen Fruktose (in Form von Insulin), ohne daß dabei zusätzliche Glukose im Urin ausgeschieden wurde. Die Versuche von *Minkowski* (1893), *Weintraud* und *Laves* (1894) erbrachten den Beweis, daß beim diabetischen (pankreatektomierten) Hund die Fruktose — im Gegensatz zu Glukose — vollständig verwertet wird. *Minkowski* wies nach, daß die Fruktose in Leberglykogen übergehen kann. *Weintraud* und *Laves* stellten nach Fruktoseinjektion eine Erhöhung des respiratorischen Quotienten fest, welche bei Glukoseinjektion ausblieb. Diese älteren Beobachtungen sind neuerdings mit modernen Methoden bestätigt worden. *Chernik* und *Chaikoff* (1951) untersuchten mit den radioaktiv markierten Zuckern die Fruktose- und Glukoseverwertung bei diabetischen Ratten und kamen zu dem Ergebnis, daß bei diabetischen Ratten die Fruktose gleich schnell veratmet wird wie bei normalen, während die Glukoseverwertung stark herabgesetzt war. *Pletscher* und *HESS* beobachteten beim diabetischen Hund einen normalen Anstieg des Pyruvats im Blut nach Fruktoseverabreichung. Nach Glukose trat dieser Effekt nicht auf. Alle diese Versuchsergebnisse sprechen dafür, daß die im diabetischen Organismus existierenden Hindernisse für die Verwertung der Glukose für die Aufnahme der Fruktose nicht bestehen.

Es ist bekannt, daß Fruktose unter gewissen Bedingungen rasch in Glukose übergehen kann und dementsprechend die gleichen metabolischen Veränderungen erleidet wie Glukose. Im Rahmen dieser Arbeit werden wir jedoch jene Erscheinungen hervorheben, welche bei der direkten (d. h. nicht über die Glukose verlaufenden) Einglie-

derung der Fruktose in den Stoffwechsel auftreten. *Stuhlfauth*, *Pletscher*, *Weichselbaum* und *Miller* haben in großen Versuchsserien dieses Problem am normalen Menschen untersucht und kamen zu folgenden Ergebnissen: 1. Nach Einspritzung von Fruktose wird die Konzentration des reduzierenden Zuckers im Blut nie so hoch wie nach Einspritzung einer gleichen Menge Glukose. Es wird also die Fruktose sehr schnell verwertet. 2. Die Konzentration der Glukose im Blut nimmt einige Minuten nach Injektion von Fruktose beträchtlich ab. Es wird also Glukose teilweise durch Fruktose ersetzt. *Wallenfels* erklärt diese Erscheinung durch einen Wettstreit zwischen der Phosphorylierung der Fruktose und des Glykogens. Bei beiden Reaktionen wird anorganisches Phosphat verbraucht: einerseits für die Resynthese des durch die Hexokinase-reaktion verbrauchten ATP, andererseits für die phosphorolytische Bildung des CORI-Esters. Bei der durch die Leber rasch erfolgenden Phosphorylierung der Fruktose wird das anorganische Phosphat der Leberzellen erschöpft. Wegen des Phosphatmangels stockt die Glykogenolyse in der Leber, während der Glykoseverbrauch in der Peripherie unverändert weitergeht. Es muß daher zwangsläufig zu einem Sturz der Glykosekonzentration im Blut kommen. Nach etwa 15 Minuten wird entsprechend dem weiteren Abbau der Fruktose das ursprünglich fixierte Phosphat wieder freigegeben und die Glykogenolyse kommt wieder in Gang. Tatsächlich stellt man nach Fruktoseinjektion eine leichte Abnahme des anorganischen Phosphates im Blut fest, welche man auf die Veresterung des anorganischen Phosphates in den Geweben, besonders in der Leber, zurückführen könnte.

Beim Diabetiker und pankreatektomierten Hund wird nach Fruktoseinjektion eine solche Senkung des Blutzuckerspiegels nie beobachtet. Es tritt vielmehr eine leichte Erhöhung der Blutglukosekonzentration ein. Es scheint also ein Teil der Fruktose in Glukose überzugehen. Die Möglichkeit einer solchen Umwandlung von Ketose in Aldose ist schon lange bekannt. Wie oben erwähnt hat schon *Minowski* eine Zunahme des Leberglykogens nach Fruktoseinjektion beobachtet. Den Beweis für diese Umwandlung hat *Pflüger* (1908) erbracht. An glykogenfrei ernährten Hunden zeigte er, daß die Hy-

droyse des Leberglykogenextraktes nach Einnahme großer Mengen Fruktose nur Glukose ergab. Da in der Nahrung die Fruktose das einzige vorgebildete Kohlehydrat war, mußte die Dextrose des Glykogens notwendigerweise aus der eingenommenen Ketose stammen. Neuerdings haben jedoch *S. Peat*, *P. J. P. Roberts* und *W. J. Whelan* (1951) im Glykogen der Kaninchenleber durch Amylaseabbau ein fruktosehaltiges Dissacharid nachweisen können.

Es ist anzunehmen, daß eine gewisse Menge Fruktose immer in Glukose übergeht. Beim Normalen wird diese Umwandlung nicht zu einer Hyperglykaemie führen, da der Verbrauch der Glukose schneller erfolgt als ihre Bildung aus Fruktose. Beim Diabetiker dagegen ist der Glukoseverbrauch verlangsamt, so daß sich die Umwandlung von Fruktose in Glukose unter Umständen als Hyperglykaemie manifestiert. *P. Plancherel* und *S. Moeschlin* haben in einer kürzlich erschienenen Arbeit gezeigt, daß der Diabetiker beträchtliche Mengen von Fruktose (bis 160 g/die) ohne Erhöhung des Blutzuckers und ohne erhöhten Insulinbedarf verwerten kann. Wesentlich scheint zu sein, daß man die Tagesmenge auf viele kleine Dosen verteilt.

Die Faktoren, welche den Stoffwechsel der Fruktose im Sinne des Abbaus oder der Glykogenbildung lenken, sind noch nicht bekannt. Die starke Zunahme der Brenztraubensäure im Blut, die man nach Fruktoseinjektion beim normalen Tier und beim Menschen beobachtet, ist Ausdruck für den Abbau der Fruktose durch glykolytische Prozesse. Bei pankreaslosen Hunden ist bei Abwesenheit von Insulin diese Pyruvaterhöhung geringer (Pletscher), woraus man schließen darf, daß die abgebaute Fruktosemenge geringer ist. Die Fruktose scheint hier also vorwiegend zur Auffüllung der erschöpften Glykogendepots der Leber zu dienen. Die Experimente von *Stetten* und *Boxer* über die Verteilung und Verwertung der Glukose haben gezeigt, daß bei der gut ernährten Ratte, deren Glykogenvorräte aufgefüllt sind, nur eine geringe Menge des Zuckers als Glykogen fixiert wird, der größte Teil der nicht verbrannten Glukose geht in Fettsäuren über. Man kann annehmen, daß bei der Fruktose ähnliche Verhältnisse vorliegen. Je mehr die Glykogendepots in Muskel und Leber erschöpft sind, desto höher wird die Menge der Fruktose sein, die in Glukose und Glykogen umgesetzt wird.

In ihrer Einwirkung auf den Inselapparat sind bei der Glukose und Fruktose ebenfalls Unterschiede festzustellen. Bei Verabreichung von Fruktose bleibt der *Staub*-Effekt aus. Die Fruktose veranlaßt also die Inselzellen nicht zu erhöhter Insulinausschüttung. Die Wirkung des Insulins auf die Glukoseverwertung ist eine spezifische. *Cori* und *Cori* untersuchten die Wirkung des Insulins auf Glukose-, Fruktose- und Mannoseaufnahme bei der eviscerierten Ratte und stellten dabei fest, daß Insulin lediglich die Aufnahme von Glukose stimulierte. *Lundsgaard* und Mitarbeiter kamen zum gleichen Ergebnis bei Versuchen am perfundierten Hinterbein der Katze; bei Zugabe von Insulin wurde der Glukoseverbrauch erhöht, nicht aber der Fruktoseverbrauch. Muskel und Leber enthalten für die Phosphorylierung von Glukose und Fruktose zwei verschiedene Enzyme (*Cori* und *Slein*, *Leuthardt* und *Testa*). Im Sinne einer früher von der Schule *Cori's* aufgestellten Theorie, wonach der Angriffspunkt des Insulins in der Hexokinasereaktion liegt, könnte man annehmen, daß die Fruktokinase vom Insulin unabhängig ist. Da aber der Mechanismus der Insulinwirkung noch in keiner Weise geklärt ist, muß die Frage nach Ursache des unterschiedlichen Verhaltens von Glukose und Fruktose vorläufig offen bleiben. Jedenfalls muß der Angriffspunkt des Insulins in einer sehr frühen Phase des Stoffwechsels gesucht werden, in der Glukose und Fruktose noch verschiedene Wege gehen. Für diese Annahme spricht u. a. auch die Tatsache, daß die Aufnahme von C^{14} -markierter Brenztraubensäure durch das isolierte Rattenzwerchfell durch Insulinzusatz nicht gesteigert wird.

Im Jahre 1940 führte *Gemill* das isolierte Rattenzwerchfell als Objekt für Untersuchungen über die Insulinwirkung *in vitro* ein. Seitdem hat diese Methode wegen ihrer Einfachheit und relativ geringer Fehlerquellen verbreitete Verwendung gefunden. Der Zweck der vorliegenden Arbeit ist, am isolierten Rattenzwerchfell die Verwertung der Fruktose und der Glukose mit und ohne Insulinzusatz zu vergleichen, um festzustellen, ob sich ähnliche Unterschiede zwischen den beiden Zuckern ergeben wie beim intakten Tier.

Experimenteller Teil

Methoden und Materialien

Versuchstiere: Die Ernährung der Ratten erfolgte nach der in unserem Institut gebräuchlichen Diät: 25% Weizenflocken, 25% Hafer, 12,5% Maisschrot und je 6,25% Lucerne, Sonnenblumenmehl, Nährhefe, Fleischmehl, Kleie, Milchpulver. Die Tiere wurden 18 bis 24 Stunden vor jedem Versuch auf Hunger gesetzt. Das Gewicht der Ratten bewegte sich zwischen 80 g und 130 g. Das Geschlecht wurde bei unseren Versuchen nicht berücksichtigt.

Inkubationsmedium für die Zwerchfelle: Es wurde der von STADIE und ZAPP empfohlene kaliumfreie Puffer verwendet. Seine Zusammensetzung war: Natriumphosphat 0,040 M, MgCl_2 0,005 M, NaCl 0,080 M, Glukose bzw. Fruktose 0,2%; pH 6,8 ($5,0 \text{ NaH}_2\text{PO}_4 + 5,0 \text{ Na}_2\text{HPO}_4$). Vor dem Versuch wurde das Medium 10 min. lang mit 100% O_2 gesättigt. Die Inkubation erfolgte in 2 cm^3 des Mediums.

Das *Insulin* (phenolfrei) wurde uns vom Schweizerischen Seruminstitut Bern zur Verfügung gestellt. Die Konzentration des Insulins bei der Inkubation betrug 0,2 Einheiten pro cm^3 .

Präparation des Zwerchfells: Die Ratten werden dekapitiert und entblutet, das Abdomen mit einem queren Schnitt eröffnet und das Mesohepaticum durchtrennt. Das Zwerchfell liegt nun frei. Man kann den muskulären Anteil leicht vom Centrum tendineum unterscheiden. Rechts wird das Centrum tendineum von der V. cava caudalis durchsetzt. Im Bereiche des Centrum tendineum legt man einen kleinen Perforationsschnitt an. Das Zwerchfell bläht sich nun nach unten und wird, straff gespannt, in seiner ganzen Ausdehnung sichtbar. Die V. cava caudalis wird hieraufhin vorsichtig umschnitten. Dann erfolgt die Trennung des Centrum tendineum vom muskulären Anteil. Die Halbierung des Zwerchfells wird direkt im Tiere durchgeführt, indem man vom Sternum aus nach links und rechts schneidend das Zwerchfell von der Thoraxwand trennt.

«Soaking»-Behandlung: Die Zwerchfellohälften werden sofort in ein eiskaltes Medium gebracht, dessen Zusammensetzung in Bezug

auf Zucker-, Salz- und Sauerstoffgehalt genau. der des Inkubationsmediums entspricht. Die Zwerchfelle werden 15 min. lang in diesem Medium gelassen. Durch diesen «soaking»-Prozeß wird die Aufnahmefähigkeit des Zwerchfells für Zucker erhöht. Nach dem «soaking» werden die Zwerchfelle sofort in das Inkubationsmedium gebracht und die Atmosphäre 10 min. lang mit 100% O₂ gesättigt. Hierauf folgt die Inkubation. Nach der Inkubation werden die Zwerchfelle mit Filterpapier oberflächlich getrocknet und gewogen.

Zuckerbestimmung: Die Zuckerbestimmung für Fruktose und Glukose erfolgt nach der von NELSON angegebenen photometrischen Methode nach vorheriger SOMOGYI-Deproteinisierung. Bei der NELSON-Methode wird 2-wertiges Kupfer zu Cu₂O reduziert. Das Cu₂O reduziert Arsenomolybdat zu einem blauen Farbstoff; die Absorption wird im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 525 m μ gemessen. Nach unseren Erfahrungen ergeben Endwerte von 100 bis 150 Gamma die genauesten Resultate. Wir haben unseren Ansatz daher entsprechend verdünnt.

Die Enteiweißung erfolgte nach SOMOGYI: Die Zink- und Bariumlösungen werden so eingestellt, daß 5 cm³ Zink zwischen 4,7 und 4,8 cm³ Barium benötigen, um eine eindeutige Rosarotfärbung von Phenolphthalein zu erzeugen. Beim Deproteinisieren werden Zink und Barium im Verhältnis 1:1 verwendet.

Versuchsanordnung: Die Zwerchfelle von zwei Ratten werden in je 4 möglichst gleichmäßige Teile zerschnitten und je $\frac{2}{4}$ pro Ansatz verwendet, so daß das Zwerchfell jeder Ratte in den Glukose- und Fruktoselösungen gleich stark repräsentiert ist. Die Inkubation erfolgte in 25 cm³ Erlenmeyerkolben bei 38° C, Schüttelfrequenz 140 pro min., Versuchsdauer 1 Stunde.

Beispiel für einen Ansatz:

Kolben Nr.	1	2	3	4	5	6
Glukose mg	4	4	4	—	—	—
Fruktose mg	—	—	—	4	4	4
Puffer cm ³	2	2	2	2	2	2
Insulin Einh.	—	—	0,4	—	—	0,4
Zwerchfell	—	2/4	2/4	—	2/4	2/4

Messung: Zur Bestimmung des Zuckerverbrauches wurde nach der Inkubation der im Ansatz verbleibende Zucker gemessen und die Differenz zur ursprünglichen Zuckermenge bestimmt. Diese Differenz in mg wurde dann auf 100 mg feuchten Zwerchfellgewebes bezogen.

Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle 1

Experiment Nr.	Anzahl Ratten	Glukoseaufnahme mg/100 mg feuchten Gewebes/h		Fruktoseaufnahme mg/100 mg feuchten Gewebes/h	
		In Glukose	In Glukose + Insulin	In Fruktose	In Fruktose + Insulin
1.	2	1,230	2,420	0,230	0,740
2.	2	0,660	1,128	0,254	0,835
3.	2	0,575	1,140	0,373	0,185
4.	2	0,268	1,882	0,228	0,344
5.	2	2,170	3,790	0,630	0,517
6.	2	1,330	2,400	0,631	0,950
7.	2	0,512	1,465	0,500	1,130
8.	2	0,498	1,080	0,696	0,656
9.	2	0,386	0,800		
10.	2	0,452	0,838		
11.	2	0,682	1,055	0,398	0,378
12.	2	0,319	0,415	0,143	0,166
13. T*	4	0,712	1,115	0,253	0,360
14. T	4	0,765	1,495	0,805	0,695
15. T	4	0,865	1,370	0,405	0,342
Mittel		0,762	1,493	0,455	0,561

* Die mit T bezeichneten Versuche wurden im Sommer 1952 von Herrn Dr. E. Testa an unserem Institut durchgeführt. Versuchsbedingungen: KREBS-Puffer, Zuckerkonzentration 400 mg%, 3 cm² Ansatz, Inkubationsdauer 90 min.

Tabelle 2

Die unter Insulineinwirkung verwerteten Fruktose- und Glukosemengen. Berechnung: Zuckerverwertung unter Insulineinfluß minus Zuckerverwertung ohne Insulin.

Exp. Nr.	Glukose mg plus.	Fruktose mg	
		plus	minus
1.	1.190	0.510	
2.	0.468	0.581	
3.	0.565		0.188
4.	1.614	0.116	
5.	1.620		0.113
6.	1.070	0.319	
7.	0.953	0.630	
8.	0.582		0.040
9.	0.414		
10.	0.386		
11.	0.374		0.020
12.	0.096	0.023	
13.	0.403	0.107	
14.	0.730		0.110
15.	0.505		0.063
Mittel	+0.731	+0.135	

Signifikanz: $t = 4.06$; $P =$ kleiner als 0.001.

Tabelle 3

t-Test für sämtlich mögliche Paarkombinationen.

	In Glukose	Glukose+Insulin	Fruktose
Glukose + Insulin	t= 2.88 P= 0.01		
Fruktose	t= 2.26 P= 0.05	t= 4.41 P= 0.001	
Fruktose + Insulin	t= 1.27 homogen	t= 3.64 P= 0.01	t= 1.34 P= homogen

Zusammenfassung

Die vorstehende Untersuchung ergibt demnach folgende Resultate:

1. Insulin stimuliert eindeutig die Glukoseaufnahme durch das isolierte Rattenzwerchfell.
2. Bei der Fruktoseverwertung ist diese stimulierende Wirkung des Insulins nicht vorhanden.

Das Resultat dieser Arbeit bestätigt demnach am isolierten Gewebe die am intakten Tier gefundene Tatsache, daß die Verwertung der Fruktose vom Insulin abhängig ist. ^{Witt}Lundsgaard kam durch eine andere Methodik zum gleichen Ergebnis, daß Insulin keinen Einfluß auf die Fruktoseaufnahme des Muskels ausübt.

Herrn Professor F. Leuthardt und Herrn Dr. E. Testa möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank für ihre wertvollen Ratschläge und stete Hilfsbereitschaft aussprechen.

1. Brown D. H., Park C. R., Daughaday N. H., Cornblath M., The influence of preliminary soaking on glucose utilization by rat diaphragm. *J. Biol. Chem.* 197, 167, 1952.
2. Cori C. F., The effect of anterior pituitary extract and of insulin on the hexokinase reaction *J. Biol. Chem.* 160, 633, 1945.
3. Cori C. F., Enzymatic reactions in carbohydrate metabolism, Harvey Lecture Series, XLI (1945-46), 253-272.
4. Gemill G. S., *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 68, 329, 1941.
5. Krahl M. E., Cori C. F., The uptake of glucose by the isolated diaphragm of normal, diabetic and adrenalectomized rats, *J. Biol. Chem.* 170, 607, 1947.
6. Krahl M. E., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 54, 649-670, 1951.
7. Leuthardt, F., Testa E., *Le métabolisme du fructose.*
8. Lundsgaard, *Acta Physiolog. Skand.*, 8, 162-172.
9. Nelson N., A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375, 1944.
10. Peat S., Roberts P. J. P., Whelan W. J., The occurrence of fructose in rabbit-liver glycogen. *Biochem. Journ.* 51, XVII, 1952.
11. Plancherel P., Moeschlin S., Über die Verträglichkeit der Fructose bei Diabetes mellitus. *Schweiz. Medizin. Wochenschr.* 84, 2, S. 28, 1954
12. Pletscher A., Fahrländer H., Staub H., Fructoseumsatz bei Gesunden Diabetikern und Leberkranken. *Helv. Physiol. Acta* 9, 46, 1951.
13. Pletscher A., Hess W., Fructoseumsatz bei normalen und pankreatektomierten Hunden. *Helv. Physiol. Acta* 9, 338, 1951.
14. Somogyi M., Determination of blood sugar, *J. Biol. Chem.* 160, 69, 1945
15. Stadie W., Zapp. J. A., The effect of insulin upon the synthesis of glycogen by rat diaphragm in vitro. *J. Biol. Chem.* 170, 55, 1947.

Lebenslauf

Geboren am 29. März 1925 in Schanghai, China. Deutscher Staatsangehöriger. Schulbildung an der Public and Thomas Hanbury School for Boys und Kaiser-Wilhelm-Schule, Schanghai, an der ich 1944 die Maturitätsprüfung bestand. Im Sommersemester 1947 Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Zürich. In den Sommerferien 1947 studentische Arbeitskolonie in Muttbach (Wallis). 1. propädeutisches Examen 1950. Sommer 1951 Leiter der studentischen Arbeitskolonie in Safienplatz (Graubünden). Während der Frühlingsferien 1952 Praktikum an der 1. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt a.M. In den Sommerferien 1953 Praktikum an der medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.

